

家蚕细胞色素 P450 基因 *Bmcyp6u1* 的克隆、序列分析与表达谱

曾媛琴^{1,2}, 徐康隆², 邹勇³, 张金叶³, 张春冬³, 杜文华¹,
隆耀航¹, 米智¹, 朱勇^{1,*}

(1. 西南大学生物技术学院, 重庆 400716; 2. 西南大学生命科学学院, 重庆 400716;

3. 西南大学蚕学与系统生物学研究所, 重庆 400716)

摘要: 细胞色素 P450 第 6 亚家族基因为昆虫所特有, 与抗性相关。为了检测家蚕 *Bombyx mori cyp6u1* 基因是否与耐氟性相关, 首先克隆了 *cyp6u1* 基因。采用生物信息学方法获得与黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster cyp6u1* 基因同源的家蚕 *B. mori cyp6u1* 基因序列, 预测该序列的开放阅读框(ORF)为 1 476 bp, 编码 491 个氨基酸, 推定的蛋白质分子质量为 56.15 kD, 等电点为 9.23。以家蚕 5 龄第 3 天幼虫精巢 cDNA 为模板, 设计特异引物 PCR 扩增出一条约 1 500 bp 的条带, 大小与家蚕 *cyp6u1* 序列的 ORF 预测值接近, 命名为 *Bmcyp6u1* 基因(GenBank 登录号: HM130560)。同源性分析表明, *Bmcyp6u1* 基因与蜜蜂 *Apis mellifera* 的同源基因 *cyp6AS13* 的相似性为 56%, 与拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的 *cyp72A82* 的相似性为 48%, 与人 *Homo sapiens* 的 *cyp3A7* 基因的相似性为 50%。芯片数据分析表明, *Bmcyp6u1* 基因在家蚕 5 龄第 3 天幼虫各组织表达量很低, 只在精巢组织(5 龄第 3 天)稍有表达, 推测该基因具有组织特异性。

关键词: 家蚕; *Bmcyp6u1*; 基因克隆; 序列分析; 表达特征

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2010)11-1195-07

Molecular cloning, sequence analysis and expression profiling of *Bmcyp6u1*, a cytochrome P450 family gene of the silkworm, *Bombyx mori*

ZENG Yuan-Qin^{1,2}, XU Kang-Long², ZOU Yong³, ZHANG Jin-Ye³, ZHANG Chun-Dong³, DU Wen-Hua¹, LONG Yao-Hang¹, MI Zhi¹, ZHU Yong^{1,*} (1. College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2. School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400716, China; 3. Institute of Sericulture and Systems Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Cytochrome P450 subfamily 6 genes are specific for insects and associated with resistance. The *cyp6u1* gene of the silkworm, *Bombyx mori*, was cloned to test whether the *cyp6u1* is related with the fluorine resistance. The sequence homologous with *Drosophila melanogaster cyp6u1* gene was obtained using bioinformatics method, from which it was predicted that the open reading frame (ORF) is 1 476 bp in length, encoding 491 amino acids. The molecular weight of the deduced protein is 56.15 kD and the isoelectric point is 9.23. Using the testis cDNA of day-3 5th instar larvae of the silkworm as the template to amplify with PCR primers designed, we obtained a band of 1 500 bp. The ORF is close to the predicated value of the silkworm *cyp6u1*, which was named *Bmcyp6u1* (GenBank accession number: HM130560). Homologous analysis showed that it is closely related to *cyp6AS13* from *Apis mellifera* (56%), *cyp72A82* from *Arabidopsis thaliana* (48%) and *cyp3A7* from *Homo sapiens* (50%). Microarray data analysis showed that *Bmcyp6u1* gene from day-3 5th instar larvae of the silkworm had very low expression level in all tissues, and was only slightly expressed in testis tissue. These results suggest that the gene has tissue specificity.

Key words: *Bombyx mori*; *Bmcyp6u1*; molecular cloning; sequence analysis; expression pattern

细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP), 又称多功能氧化酶 (mixed-function oxidases, MFO), 是

一种广泛存在于细菌、真菌、植物和动物体中的氧化酶系 (Estabrook, 1996)。昆虫细胞色素 P450 参

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(XDJK2010C089)

作者简介: 曾媛琴, 女, 1972 年生, 江西金溪人, 博士, 研究方向为资源生物学与遗传改良, E-mail: yqzeng@swu.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhuy@swu.edu.cn

收稿日期 Received: 2010-05-11; 接受日期 Accepted: 2010-09-12

与多种外来物质和内源物质的代谢,与昆虫的生长发育及对环境适应性具有重要的关系 (Feyereisen, 1999; Scott and Wen, 2001)。P450s 在昆虫中的作用涉及生长、发育和取食等过程,参与了昆虫体内保幼激素、蜕皮激素和脂肪酸等内源化合物的合成与代谢,其对异生物质的代谢特性导致了昆虫对杀虫剂的抗药性和对植物有毒物质的耐受性 (Scott *et al.*, 1998; Feyereisen, 1999)。目前已鉴定的昆虫细胞色素 P450 有 8 个亚家族,其中第 6 亚家族为昆虫所特有,具有环境应答的特点,和昆虫的抗药性有关 (David, 1998; Claudianos *et al.*, 2006; Feyereisen, 2006)。*Cyp6a1* 是首次从家蝇 *Musca domestica* 抗性株中分离出昆虫细胞色素 P450 第 6 家族基因。Andersen 等 (1994) 在大肠杆菌 *Escherichia coli* 细胞中表达了由该基因编码的 Cyp6a1 蛋白,并重建杀虫剂代谢的 P450 系统,结果表明该系统在环二烯 (cyclodiene) 杀虫剂艾氏剂 (aldrin) 和七氯 (heptachlor) 的环氧化代谢中起作用,从而证实 *Cyp6a1* 与昆虫抗药性有关。研究发现, *CYP6D* 基因在抗药性的产生中具有重要作用, *CYP6B* 与植物毒素抗性相关 (Tomita and Scott, 1995), *cyp6a1*, *cyp6a2*, *cyp6a8*, *cyp6a9* 与 *cyp6g1* 这些基因在抗性品系中过量表达 (Feyereisen *et al.*, 1989; Waters *et al.*, 1992; Cohen *et al.*, 1992; Daborn *et al.*, 2001)。

家蚕 *Bombyx mori* 细胞色素 P450 基因组学分析发现,家蚕共有 85 个细胞色素 P450 基因,其中有 78 个功能基因。家蚕中 60% 的 P450s 属于 CYP4 与 CYP6 家族 (李斌等, 2004)。近年来,本课题组也已经克隆了多个 P450 基因,如 *cyp337A1*, *cyp18A1*, *cyp6AE2*, *cyp9A* 基因簇和 *cyp6a8* 等等。

除了果蝇 *cyp6u1* 基因在基因组测序时得到基因序列外,从其他物种中都没有克隆出 *cyp6u1*,对 *cyp6u1* 基因功能更是无从知晓。本研究在家蚕耐氟实验中发现,氟中毒家蚕的精巢组织蓄积氟,但是在蚕卵中却未发现氟离子的存在。生殖腺中是否存在解毒酶 (比如 P450 第 6 家族基因) 发挥作用? 我们选取了 P450 第 6 亚家族基因 *cyp6u1*, 该基因只在精巢中表达,希望就此揭开 *cyp6u1* 基因的研究序幕,首先进行克隆分析,以便后续再进行耐氟性检测。本研究采用生物信息学和生物技术方法克隆并分析该基因的序列及芯片表达谱特征,为进一步研究 *cyp6u1* 基因在家蚕中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

供试家蚕品种为大造,由西南大学家蚕基因资源库保存。25℃ 恒温,相对湿度 75%±5%,每天喂养 3 次新鲜桑叶饲养至 5 龄第 3 天,解剖获取精巢组织,用生理盐水和 DEPC 水冲洗后,液氮速冻, -80℃ 保存备用。

Trizol Reagent 总 RNA 提取试剂、M-MLV 反转录酶、RNA 酶抑制剂、胶回收试剂盒均购自上海生工生物工程技术服务有限公司; pMD19-T 载体、DL2000 DNA Marker、Taq 酶均购自 TaKaRa 公司; 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 由本实验室保存。

1.2 家蚕精巢组织总 RNA 的提取及 cDNA 第 1 链的合成

从 -80℃ 冰箱中取出家蚕精巢组织,称取 100 mg 左右放入研钵,加入液氮充分研磨,参照 Trizol Reagent 试剂说明书方法提取总 RNA。按照反转录试剂盒的说明合成 cDNA 第 1 链。

1.3 引物设计

从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster cyp6u1* 基因 (GenBank 登录号: NM_136408) 的蛋白质序列,与家蚕 9 倍基因组数据库中所预测的家蚕基因蛋白质序列进行 BLASTP 比对 ($E\text{-value} < 1e^{-10}$), 得到 2 条 *cyp6u1* 基因蛋白的相似序列; 再将这些蛋白序列与家蚕 EST 数据库进行 BLASTN 比对 ($E\text{-value} < 1e^{-10}$), 得到 16 条 EST 序列, 将这些 EST 序列通过电子克隆拼接获得家蚕 *cyp6u1* (*Bmcyp6u1*) 基因的预测序列。根据预测的 *Bmcyp6u1* 基因序列设计引物: P1 (5'-TGATTCTGTTGTTAACCGTG-3'), P2 (5'-CAAATTTTCAGCCATATCCC-3'), 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.4 家蚕 *cyp6u1* 基因的克隆及测序

以家蚕精巢组织 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增。RT-PCR 扩增条件: 94℃ 变性 4 min; 94℃ 40 s, 56℃ 40 s, 72℃ 1 min 20 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色鉴定。

PCR 产物琼脂糖凝胶电泳后,按照试剂盒说明书进行胶回收。将回收产物与 pMD19-T 载体 16℃ 连接过夜,转化到 *E. coli* DH5α 感受态细胞,涂布于加有氨苄青霉素、IPTG 和 X-gal 的平板上; 培养

16 h, 挑取白色单菌落进行菌落 PCR。挑取有目的条带的菌落在 LB 液体培养基(氨苄青霉素终浓度为 1%)中培养。阳性克隆送交上海英骏生物技术有限公司测序。

1.5 家蚕 *cyp6u1* 基因序列分析

同源性比对采用 BLAST 工具; 设计引物采用 Primer 5.0 软件; 通过 Expasy 网站 (<http://ca.expasy.org/tools/>) 预测蛋白质分子质量和等电点; 使用 SMART 程序 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测蛋白质结构域; 蛋白质多序列比对采用软件 ClustalX 1.83; 氨基酸序列聚类分析采用软件 MEGA 4.0。

1.6 家蚕 *cyp6u1* 基因芯片表达分析

家蚕 *cyp6u1* 基因 DNA 序列提交 ExPasy (<http://us.expasy.org/tools/dna.html>) 得到其蛋白质序列。与家蚕 9 倍基因组数据库 (<http://silkworm.genomics.org.cn/>) 中所预测的家蚕基因蛋白质序列进行 BLASTP 比对 ($E\text{-value} < 1e^{-10}$), 得到基因家族的横向同源基因探针 28 个。下载各探针 5 龄第 3 天各组织表达数据。用软件 Cluster 3.0 Manual 制作芯片表达谱。同时, 分析 5 龄第 4 天后直至上簇、化蛹及成蛾等不同时期家蚕 *cyp6u1* 基因的转录活性。

2 结果

2.1 家蚕 *cyp6u1* 基因的克隆

通过电子克隆方法延伸得到 *Bmcyp6u1* 基因, 预测长度为 1 476 bp。以家蚕 5 龄第 3 天的幼虫精巢组织 cDNA 为模板, PCR 扩增得到一条 1 500 bp 左右的条带, 与预测目标产物大小相近。测序结果与预测的基因序列一致, 将该序列提交到 GenBank, 登录号为 HM130560。

2.2 家蚕 *cyp6u1* 基因的序列分析

通过 NCBI 在线 TblastX 分析及 ExPASy 预测, *Bmcyp6u1* 基因包含了一个完整开放阅读框 (ORF), 编码 491 个氨基酸; 预测蛋白质分子质量和等电点分别为 56.15 kD 和 9.23。将克隆结果与家蚕基因组数据库比对, 结果显示 *Bmcyp6u1* 位于 10 号染色体上 (scaffold: nscaf2855), 没有内含子 (图 1)。

蛋白质多序列比对发现, *Bmcyp6u1* 及其同源序列含有所有昆虫 P450 基因的 5 个特征序列 (Waters *et al.*, 1992; Feyereisen, 1999): WxxxR 基序; P450 氧结合序列: AGxET; 位于螺旋 K 中参与

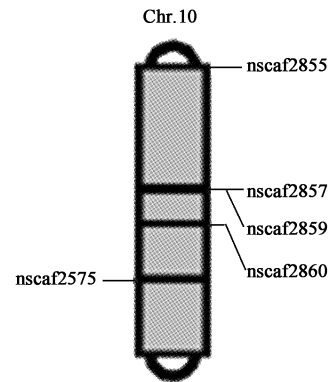


图 1 家蚕 *cyp6u1* 基因的染色体定位
Fig. 1 Chromosomal location of *cyp6u1* gene of the silkworm, *Bombyx mori*

稳定 P450 的核心结构: ExLR; 微粒体 P450 酶保守区序列 “PERF”: PxxFxPERF; 血红素结合位点: PFxxGxxxCxG/A (图 2, 3)。

2.3 家蚕 *cyp6u1* 基因的同源性分析

将 *Bmcyp6u1* 基因编码氨基酸序列在 NCBI 及 Ensembl 中进行 Tblast 同源性检索, 发现与蜜蜂 *Apis mellifera* 同源基因 *cyp6AS13* 相似性为 56%, 与赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 同源基因 *cyp6BK17* 和致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 同源基因 *cyp6a8* 相似性均为 54%, 与意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 同源基因 *cyp6a8* 相似性为 51%, 与黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 同源基因 *cyp6a2* 相似性为 53%, 与人 *Homo sapiens* 同源基因 *cyp3A7* 相似性为 50%, 与拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的同源基因 *cyp72A8* 相似性为 45%。*Bmcyp6u1* 基因与致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、意大利蜜蜂 *Apis mellifera*、原鸡 *Gallus gallus*、斑马鱼 *Danio rerio*、人 *Homo sapiens*、小鼠 *Rattus norvegicus*、红鳍东方鲀 *Fugu rubripes*、秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 和拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 等 12 种物种的同源基因构建进化树, 发现 *Bmcyp6u1* 基因与昆虫同源基因同源性较高 (图 4)。

从 NCBI 上下载人 *H. sapiens*、黑腹果蝇 *D. melanogaster*、斑马鱼 *D. rerio*、意大利蜜蜂 *A. mellifera*、秀丽隐杆线虫 *C. elegans* 和拟南芥 *A. thaliana* 的基因组数据, 用 *Bmcyp6u1* 蛋白序列进行同源性比对, 选取相似性较高的序列 209 个, 用 MEGA 4.0 软件中的邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统进化树。发现 *Bmcyp6u1* 与蜜蜂和果蝇 P450 超基因家族第 6 亚族基因编码蛋白序列同源关系最近。

1	ATG TGG TTA AGT GTA TTA TTA GTG GTG ATT TTA CTG TTT TTG ATT CTG TTG TTA ACC GTG	61
1	M W L S V L L V V I L L F L I L L L T V	20
62	TTT CAC TAT ACG ACT AAA GGA AGA AAA TAT CGG TTG TTA CGA AAT GTA CCT TAC AGA GAA	121
21	F H Y T T K G R K Y R L L R N V P Y R E	40
122	CCA TGT CCG TTA TTT GGA AAT TTT GGA GCA ACG TTC ACT ATG AGG AGA AGC TAC ACA AAA	181
41	P C P L F G N F G A T F T M R R S Y T K	60
182	ATG TTG CAA TTT TTT TAC GAT AAT TAT TAT AAT GAG AAA TAC GTG GGA ATT TTT CAA GCA	241
61	M L Q F F Y D N Y Y N E K Y V G I F Q A	80
242	CGG AGG CCG ACA TTA ATG CTC ATA GAT TTA GAA CTG GTG AAA AAT GTA TTA TCT AAA GAA	301
81	R R P T L M L I D L E L V K N V L S K E	100
302	TTT CCG AAT TTC AGC GAT CGC ATA TCT GTT ACG ACC GAT ACG CAG CGG GAA CCA TTG CTT	361
101	F P N F S D R I S V T T D T Q R E P L L	120
362	CGG AAT TTA GCT AAT ATG AGT GGA GCT GAA TGG AAA GCT ATG AGG CAG ATT GTA ACG CCA	421
121	R N L A N M S G A E <u>W K A M R</u> Q I V T P	140
基序: WxxxR		
422	ACA TTT TCA TCG GCG AAA ATG AAA GCT ATG TTT TCA TTG AIA GCG GAA TGT GCT CAA GCA	481
141	T F S S A K M K A M F P L I A E C A Q A	160
482	TTA AAA AAT AGT CTA CTT AAG GAG TCT CTC GCG GAA GTT AAT GTG CCC GAT TTT ATG ACA	541
161	L K N S L L K E S L A E V N V P D F M T	180
542	CGA TTT ACT ACA GAT GTA ATT GGT AGT TGT GCC TTC GGA GTC GAC CCT GGT TCT CTG AAA	601
181	R F T T D V I G S C A F G V D P G S L K	200
602	GAT CCC GAG TCT CCA TTC TTA AAA ATG TCG CAA AAA ATG TTT AAA ATT GAT CGT TCT ACT	661
201	D P E S P F L K M S Q K M F K I D R S T	220
662	GTT TTA AAA CGC TAT TGT ALA ACG TTT TTT CCA AAG CTG TTT AAA TTT TTG AAT CTC AGA	721
221	V L K R Y C R T F F P K L F K F L N L R	240
722	ACA TAC TCA AAG GAT GTG GAA ACG TTT TTT ACA ACT ATT AAG AAA GTT CTC GAT GAA	781
241	T Y S K D V E T F T I I K K V L D E	260
782	AGG CGC GCC ACG GGC GTT CAA AGA CAT GAC TTC CTA CAG CTT ATG TTG AAC GTT CAG AAA	841
261	R R A A T G V Q R H D F L Q L M L N V Q K	280
842	ACT GAA ACA AGT TTT GTT ATG ACC GAC ACA TTG ATA ATA TCG AAT TCG TTC ATT TTT ATG	901
281	T E T S F V M T D T L I I S N S F I F M	300
902	CTC GCT GGA CTA GAA TCC TCG TCT ACT ACA CTA TCG TTC TGT TTA TAT GAA TTG GCT AAA	961
301	L <u>A G L F S</u> S S T T L S F C L Y E L A K	320
P450氧结合序列: AGxET		
962	GAT AAA CAC ATC CAA GAT GAT CTC AGA ACA GAG ATT GTT GAC TGC TTA GAA AGG TAT GGT	1021
321	D K H I Q D D L R T E I V D C L E R Y G	340
1022	GGT ATA AAT TAT GAA GCA GTG TGT TCA ATG CGC TTG GTC AAC CAA GCA GTA CTA GAG ACT	1081
341	G I N Y E A V C S M R L V N Q A V L <u>E T</u>	360
1082	TTA CGA CTT CAT CCA CCG ACG CCG CTC ACG ACA CGG CTT TGC ACC AGT GCT TGT ACT CTG	1141
361	<u>L R</u> L H P P T P L T T R L C T S A C T L	380
螺旋K: ExLR		
1142	AAT GGC ACA GAT TTA AGC GTT AGA GTA AGA GAT CCC GTG TTA ATA CCT TTG TAT TGT ATT	1201
381	N G T D L S V R V R D P V L I P L Y C I	400
1202	CAG CGA GAC GCC CAA CAC TTT CCT AAT CCT GAC AAG TTC AAT CTA GAA AGG TTT AAG GAA	1261
401	Q R D A Q H F P N <u>P D K F N L E R F</u> K E	420
微粒体P450酶保守区序列PERF: PxxFxPERF		
1262	ACA AAT CCT CCT GGA TTT TTG GCT TTC GGC GAA GGA CCG AGG AGT TGT CCA GGC GCA CGA	1321
421	T N P P G F L A <u>F G E G P R S C P G</u> A R	440
血红素结合位点: FxxGxxxG		
1322	TTT GCT CAA TTG ACG GTT GCC GCG GCT CTT GCG GCT TTG CTA AGT AGT TTT GAA ATA GAA	1381
441	F A Q L T V A A L A L L S S F E I E	460
1382	CCT TGT TCC ATG ACA ACT TCC ACT ATA GTC TAT GAT CCT AGA AGT GTA ATG CTT AAG AAT	1441
461	P C S M T I S T I V Y D P R S V M L K N	480
1442	AAA GGC GGG ATA TGG CTG AAA TTT GTA CCT CTA TAA	1476
481	K G G I W L K F V P L *	500

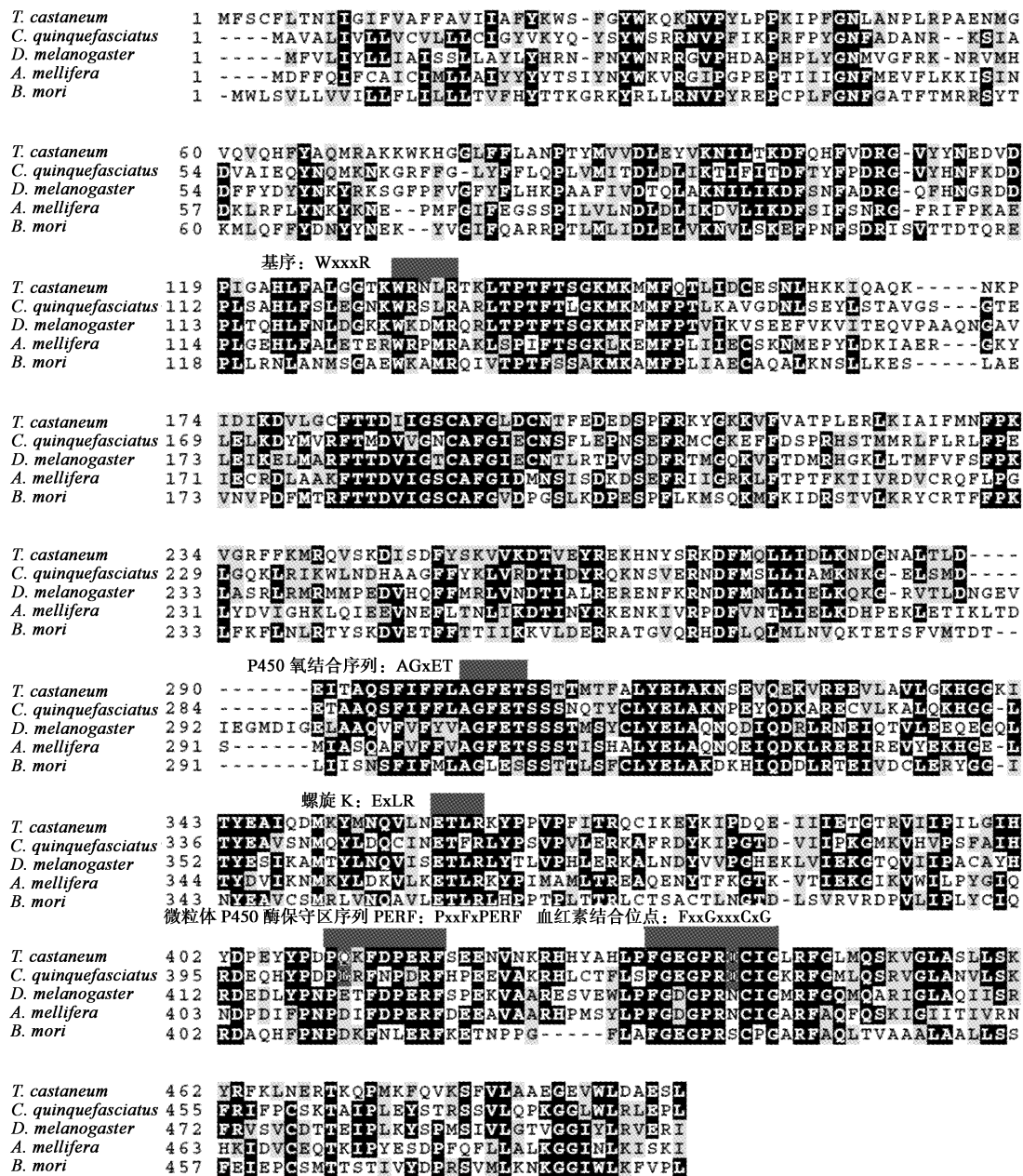
图2 家蚕 *cyp6ul* 基因 cDNA 序列和推导的氨基酸序列Fig. 2 The cDNA and deduced amino acid sequences of *cyp6ul* gene from *Bombyx mori* (*Bmcp6ul*)

昆虫 P450 基因保守序列用矩形框表示 The conserved sequences of insect P450 genes are indicated with rectangular box.

2.4 家蚕 *cyp6ul* 基因芯片表达分析

Bmcp6ul 基因序列在家蚕基因组数据库 (<http://www.silkdb.org/microarray/search.php>) 中同源性比对搜索, 获得 28 个横向同源基因及对应的探针。将这 28 个基因和 *Bmcp6ul* 在家蚕 5 龄第 3 天幼虫的表达量进行对比, 绘成基因芯片图。结果表明, *Bmcp6ul* (探针号: sw11239) 在家蚕 5 龄第 3 天所有的组织表达量都很低。最高的精巢组织的表达量只有 1 047, 是前中部丝腺的 61.59 倍、脂肪体的 34.9 倍、表皮的 18.05 倍、血液的 9.52 倍、中肠的 5.81 倍、头部的 4.14 倍、卵巢的 2.3 倍、

马氏管的 2.23 倍, 在后部丝腺完全没有表达。精巢、卵巢、头部、脂肪体、表皮、中肠、血液、马氏管、前中部丝腺和后部丝腺所有组织都取样的同等条件下, 同样在所有组织中表达量异常低 (全部低于 800) 的探针较多, 如 sw06295, sw19974, sw22034, sw19578, sw21229, sw19730, sw19303, sw20416, sw05384 和 sw15116 等 10 个; 与 *Bmcp6ul* 基因一样, 只在单个组织中表达量稍高的探针不少, 如 sw21502 (后部丝腺表达, 所有 *Bmcp6ul* 横向同源基因中只有此探针单独表达)、sw06584 (中肠)、sw12393 (表皮)、sw09427 (中肠)、

图 3 家蚕 *cyp6ul* 基因编码氨基酸序列与其他几种昆虫的同源氨基酸比对Fig. 3 Amino acid sequence alignment of *Bmcyp6ul* with homologous genes from several other insects

相同氨基酸用黑色阴影表示, 性质相近的氨基酸用灰色阴影表示, 特征序列用加粗线标示。各物种蛋白质序列登录号: 赤拟谷盗 (XP_969633); 致倦库蚊 (XP_001844834); 黑腹果蝇 (NP_523628); 意大利蜜蜂 (XP_623461); 家蚕 (HM130560)。Homologous amino acids are indicated with a black shadow frame, and similar amino acids with gray shadow. Characteristic sequences are marked with bold lines. GenBank accession numbers of protein sequences for each species are *Tribolium castaneum* (XP_969633), *Culex quinquefasciatus* (XP_001844834), *Drosophila melanogaster* (NP_523628), *Apis mellifera* (XP_623461) and *Bombyx mori* (HM130560).

sw16511(马氏管)、sw06687(马氏管)、sw20008(马氏管)等 7 个探针; 其余 11 个探针在多个组织有高亮表达, 其中包括我们克隆的基因 *Bmcyp6a8*(探针号: sw20316), 在多个组织特别是头部高量表达。

芯片数据检测转录活性表明, 5 龄第 3 天 *Bmcyp6ul* 在精巢组织存在表达峰值。5 龄 4 天后除

了上簇 36 h, 60 h 的雌蚕和成虫雄蚕, 其余各时期基因没有表达(图 5)。

3 讨论

本研究克隆了 *Bmcyp6ul* 基因, 将 *Bmcyp6ul* 基

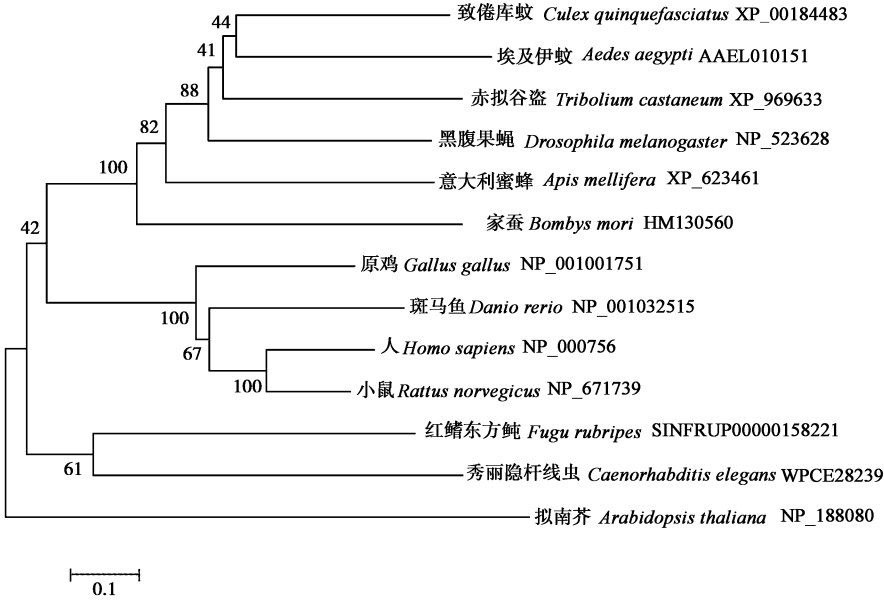


图 4 家蚕 *cyp6u1* 基因与其他 12 个物种直向同源基因的系统进化树

Fig. 4 The phylogenetic tree of *Bmcyp6u1* and its orthologous genes from other 12 species

NJ 进化树由 MEGA 软件绘制, 节点处的数字为 100 次自举检测得到的置信度。The NJ phylogenetic tree was constructed using the MEGA program. The number at the node is the statistical reliability obtained from bootstrapping with 100 replicates.

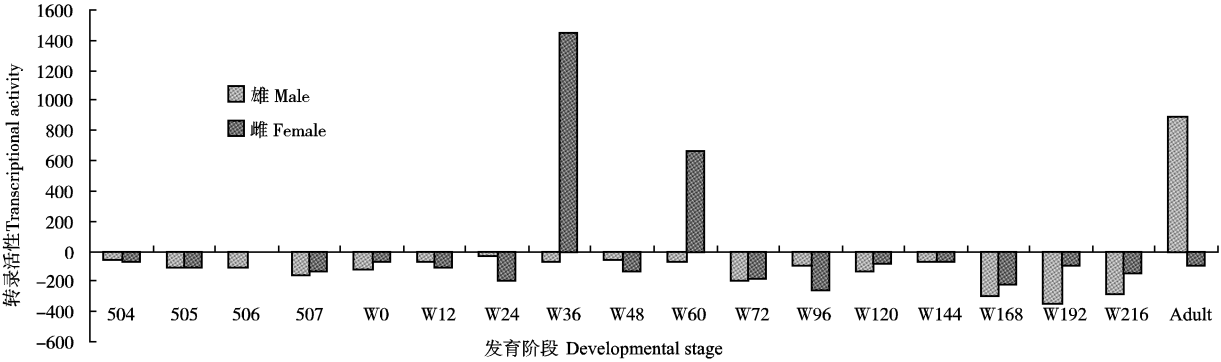


图 5 *Bmcyp6u1* 基因的转录活性

Fig. 5 Transcriptional activity of *Bmcyp6u1* gene

发育阶段 504 表示 5 龄第 4 天, W12 表示上簇 12 h; 以此类推。Developmental stage 504 indicates day 4 5th instar, W12 indicates 12 h after wandering, and the rest may be deduced by analogy. Adult: 成虫 Adult.

因编码的蛋白与赤拟谷盗、致倦库蚊、黑腹果蝇及意大利蜜蜂同源蛋白多序列比对分析显示, 它们都具有昆虫细胞色素 P450 基因的 5 个特征序列。我们发现了 P450 信号序列——血红素结合区“FxxGxxxCxG”高度保守以及螺旋 K“ETLR”这个几乎所有 CYP6 家族成员的保守序列 (Ranson *et al.*, 2002)。稍有不同的是家蚕微粒体 P450 酶保守区序列“PxxFxPERF”置换为“PxxFxLERF”, 这种置换在我们以前的研究中也出现过 (曾媛琴等, 2010), 不同的是家蚕和野桑蚕 *Bombyx mandarina* 的微粒体 P450 酶保守区序列“PxxFxPERF”置换为

“PxxFxPERH”。家蚕细胞色素 P450 基因 *cyp337A1* 也存在相同情况。P450 氧结合序列 AGxET, *Bmcyp6u1* 序列置换为 AGxES, 该保守区氨基酸的替换, 是否与鳞翅目昆虫物种不同有关, 还是与不同昆虫细胞色素 P450 功能差异相关, 有待进一步研究。

从 *Bmcyp6u1* 与人、意大利蜜蜂、黑腹果蝇、斑马鱼、秀丽隐杆线虫以及拟南芥同源基因的氨基酸序列系统进化树可以看出, 大多数 P450 基因因为物种、亚家族聚集成簇, 但是也有部分打破了种间保守。 *Bmcyp6u1*、意大利蜜蜂的 CYP6A 家族成员

与秀丽隐杆线虫的 CYP25A 家族成员聚集成簇后, 与黑腹果蝇 CYP6A 家族成员聚集成簇, 再与黑腹果蝇其他第 6 家族成员(包括 *cyp6u1*)、黑腹果蝇与意大利蜜蜂 CYP9 家族成员、人 CYP3A 家族成员聚集成簇。除此之外, 大部分细胞色素 P450 基因根据功能而聚集成簇。如意大利蜜蜂的 *cyp6BD1*、斑马鱼的 *cyp5A* 和秀丽隐杆线虫的 *cyp43A1* 基因聚集成簇, 进化关系较近; 人、斑马鱼的第 4 家族基因与蜜蜂第 4 家族基因聚集成簇; 黑腹果蝇 *cyp308a1*、*cyp309a1* 与拟南芥 *cyp711A1*、*cyp86B1* 等聚集成簇, 等等。这种现象是否从另一角度支持这种观点——“细胞色素 P450 基因由 35 亿年前的一个共同祖先进化而来, 许多功能基因的复制事件产生于物种进化之前”, 有待进一步研究确认。

Bmcyp6u1 基因是通过由黑腹果蝇 *cyp6u1* 的蛋白序列同源比对产生的家蚕电子克隆序列, 测序结果的进化树结果显示, *Bmcyp6u1* 基因和黑腹果蝇的 *cyp6u1* 进化关系却不是最近, 我们推测, 从双翅目到鳞翅目, P450 基因 *cyp6u1* 产生了一定的功能变异。

从芯片表达谱可以看到, *Bmcyp6u1* 与其横向同源基因在家蚕 5 龄第 3 天幼虫的表达特征差异显著。在所有的横向同源基因中, 相对于其他基因在各组织高量表达, 部分基因只在个别组织表达, *Bmcyp6u1* 只有在精巢组织稍有表达, 甚至有几个基因在所有组织中全无表达。我们认为, 部分基因如 *Bmcyp6a8* 等在各组织高量表达, 参与内源物质如脂肪酸等的代谢, 所以基因功能涉及生物体的生长发育, 幼虫 *Bmcyp6u1* 基因只在精巢中表达, 在其他各个组织表达量相当低, 甚至几乎没有表达, 可能只与精巢发育及精子生成相关, 具有功能特异性。转录活性研究显示, *Bmcyp6u1* 只在雄蚕成虫和雌蚕上簇 36 h 和 60 h 表达, 对其功能值得进一步实验验证。

参 考 文 献 (References)

- Andersen JF, Utermohlen JG, Feyereisen R, 1994. Expression of house fly CYP6A1 and NADPH-cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli* and reconstitution of an insecticide metabolizing P450 system. *Biochemistry*, 33(8): 2171–2177.
- Claudianos C, Ranson H, Johnson RM, Biswas S, Schuler MA, Berenbaum MR, Feyereisen R, Oakeshott JG, 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, 15(5): 615–636.
- Cohen MB, Schuler MA, Berenbaum MR, 1992. A host-inducible cytochrome P-450 from a host-specific caterpillar: molecular cloning and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 10920–10924.
- Daborn P, Boundy S, Yen J, Pittendrigh B, French-Constant R, 2001. DDT resistance in *Drosophila* correlates with *Cyp6g1* over-expression and confers cross-resistance to the neonicotinoid imidacloprid. *Mol. Genet. Genomics*, 266(4): 556–563.
- Estabrook RW, 1996. The remarkable P450s: a historical overview of these versatile heme protein catalysts. *FASEB J.*, 10: 202–204.
- Feyereisen R, 1999. Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, 44: 507–533.
- Feyereisen R, 2006. Evolution of insect P450. *Biochemical Society Transactions*, 34(6): 1252–1255.
- Feyereisen R, Koener JF, Farnsworth DE, Neber DW, 1989. Isolation and sequence of cDNA encoding a cytochrome P-450 from an insecticide-resistant strain of the house fly, *Musca domestica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(5): 1465–1469.
- Li B, Xia QY, Lu C, Zhou ZY, Xiang ZH, 2004. Genomic analysis of the cytochrome P450 in silkworm. *Science in China Ser. C Life Sciences*, 34(6): 517–521. [李斌, 夏庆友, 鲁成, 周泽扬, 向仲怀, 2004. 家蚕细胞色素 P450 的基因组学分析. 中国科学 C 辑 生命科学, 34(6): 517–521]
- Ranson H, Nikou D, Hutchinson M, Wang X, Roth CW, Hemingway J, Collins FH, 2002. Molecular analysis of multiple cytochrome P450 genes from the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*, 11(5): 409–418.
- Scott JG, Liu NN, Wen ZM, 1998. Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 121(1–3): 147–155.
- Scott JG, Wen ZM, 2001. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Manag. Sci.*, 57: 958–967.
- Tomita T, Scott JG, 1995. cDNA and deduced protein sequence of *CYP6D1*: the putative gene for a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in house fly. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25: 275–283.
- Waters LC, Zelhof AC, Shaw BJ, Chang LY, 1992. Possible involvement of the long terminal repeat of transposable element 17.6 in regulating expression of an insecticide resistance-associated P450 gene in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(11): 4855–4859.
- Zeng YQ, Mi Z, Long YH, Du WH, Zhu Y, 2010. Molecular cloning and sequence analysis of *Bmcyp6a8*, a cytochrome P450 family gene of silkworm, *Bombyx mori*. *Science of Sericulture*, 36(3): 421–427. [曾媛琴, 米智, 隆耀航, 杜文华, 朱勇, 2010. 家蚕细胞色素 P450 基因 *Bmcyp6A8* 的克隆及序列与表达分析. 蚕业科学, 36(3): 421–427]

(责任编辑: 赵利辉)